

マウスを用いた日本脳炎ウイルスの実験的垂直感染における 胎盤・胎児感染と胎児死亡の関係

誌名	農林水産省家畜衛生試験場研究報告
ISSN	03882403
著者	村上, 洋介 藤崎, 優次郎 三浦, 康男 杉森, 正 小野寺, 節 三浦, 克洋
巻/号	91号
掲載ページ	p. 1-7
発行年月	1987年12月

マウスを用いた日本脳炎ウイルスの実験的垂直感染における胎盤・胎児感染と胎児死亡の関係

村上 洋介¹ 藤崎 優次郎² 三浦 康男³
杉森 正⁴ 小野寺 節⁵ 三浦 克洋⁶

(昭和61年7月31日受付)

妊娠マウスを用いて日本脳炎ウイルスの垂直感染実験を行い、胎盤、胎児感染と胎児死亡との関係を調べたところ、次のような成績が得られた。ウイルス接種群の胎児死亡率は無処置対照群よりも高かった。ウイルス接種群のうち胎盤、胎児感染が認められなかった死亡胎児の発生率と無処置対照群における死亡胎児の自然発生率との間には有意差が認められなかった。死亡胎児例の胎盤、胎児感染率は生存胎児例のそれよりも高かった。胎盤のみの感染で死亡したと考えられる胎児例が少数みられた。胎盤から回収されるウイルス量が多いほど胎児死亡が多発する傾向がみられた。感染胎盤では、trophoblastの巨細胞内にウイルス特異蛍光抗原が認められ、またtrophoblastを中心に重度の組織病変が観察されることから、胎盤感染により胎盤の機能障害が起こるものと考えられた。以上の結果から、妊娠マウスにウイルスを接種すると胎盤、胎児感染が起こり、そのために一部の胎児は死亡するものと考えられた。胎盤感染と胎児死亡の間には特に密接な関係があるものと推察された。妊娠マウスにウイルスを接種したのち自然分娩させたところ、死亡胎児が娩出され、その一部からウイルスが回収された。このことから、妊娠マウスが日本脳炎ウイルスに感染すると、死産を起こすものと考えられた。

ウイルスの垂直感染、とくに日本脳炎ウイルス(JEV)による豚死産発生^{1,2,9,10}の機序を解明するための参考資料を得ることを目的として、マウスを用いたJEVの垂直感染実験を企図し、まず、垂直感染成立のための条件について検討した。その結果、著者らは、これまでに、マウスの系統、ウイルス接種経路、接種時の妊娠日数及びウイルス株が垂直感染の成立を左右する条件であることを明らかにした³⁻⁸。また、胎盤の感染(以下胎盤感染と略)と胎児の感染(以下胎児感染と略)との関連性について検討した結果、胎

盤感染は胎児感染成立のための必要条件であるが、十分条件ではないことが明らかにされた⁷。今回は、胎盤、胎児感染と胎児死亡との関連性について検討した結果を報告する。

材料と方法

ウイルス：実験に用いたJEV野外(AS-6)株⁹は、日本脳炎流行期の豚血液から分離され、マウス脳で3代継代されたものである。感染発症マウスの脳乳汁を接種ウイルス液として用いた。

マウス：実験には3系統のマウス、すなわちクローズドコロニーのCFW系、近交系のC3H/He系及びC57BL/6系マウスを用いた。これらの系統の由来と繁殖方法は既報³のとおりである。腔栓(Vaginal plug)の形成を確認した日を妊娠0日として実験に供した。

接種：一定濃度のウイルス液を妊娠7日又は10日のマウスに、0.2ml ずつ尾静脈内(以下静脈内と略)又は腹腔内に接種した。

- 1 Yosuke MURAKAMI: 農林水産省家畜衛生試験場研究第二部(現在、同場海外病研究部、〒187 東京都小平市上水本町1500)
- 2 Yujiro FUJISAKI: 同場研究第二部(現在、北里研究所附属家畜衛生研究所、〒277 千葉県柏市松ヶ崎1139-1)
- 3 Yasuo MIURA: 同場研究第二部(現在、同場九州支場、〒891-01 鹿児島県鹿児島市中山町2702)
- 4 Tadashi SUGIMORI: 同場研究第二部(現在、同場海外病研究部、〒187 東京都小平市上水本町1500)
- 5 Takashi ONODERA: 東京大学医学部研究所(現在、同場海外病研究部、〒187 東京都小平市上水本町1500)
- 6 Katsuhiko MIURA: 同場研究第一部(現在、農林水産省畜産試験場、〒305 茨城県稲敷郡草崎町池の台2)

細胞培養：ESK (Embryonic swine kidney established) 細胞の培養は杉森ら¹²⁾の方法により行った。

ウイルス感染価の測定：接種用ウイルス液及び感染胎盤、胎児組織乳剤のウイルス感染価測定はESK細胞を用いて既報³⁾の方法により行った。感染胎盤あるいは胎児中のウイルス量を比較する場合には、それぞれの組織乳剤の平均ウイルス感染価を算定し、*t*検定により5%の危険率での有意差の有無を判定した。

胎盤、胎児からのウイルス回収：胎盤と胎児について、1個1個別々に乳剤を作り、前報¹⁾で述べた方法によりウイルス回収を試み、胎盤、胎児感染の有無を判定した。

胎児の生死の判定：胎盤ごと胎児を取り出し、鉸で臍帯脈を切断したとき出血がみられた場合を生存、出血がみられなかった場合を死亡と判定した。胎児死亡率を比較する場合には、 χ^2 検定により5%又は1%の危険率での有意差の有無を判定した。

蛍光抗体法：Kawamura⁹⁾の方法に準じて行った。採取した胎盤、胎児を-70℃に凍結しクリオスタットで厚さ5μmの切片を作製した。スライドガラス上の切片を常温アセトンで固定し、蛍光染色するまで-70℃に保存した。フルオレスセイン・イソ・チオンア

ネート標識抗JEVウサギ血清は日本生物科学研究所(東京)から購入した。固定した切片上に10倍希釈の標識血清をのせ、37℃1時間反応させた。その後スライドガラス上の切片を燐酸緩衝液(PBSと略、pH 7.2)で15分間洗浄した。90%(V/V)のグリセリン/PBS溶液をスライドガラス上に滴下し、カバーガラスをのせて蛍光顕微鏡(千代田社、東京)で観察した。

結果

1. JEV接種群と無処置対照群における胎児死亡率の比較

CFW, C3H/He及びC57BL/6の3系統のマウスを用いた。接種群のマウスに対しては、 $10^{5.6}$ TCID₅₀/mLのウイルス液を妊娠7日に0.2mLずつ静脈内に接種したのち、7日目に解剖して胎児の生死を調べ、群ごとに総胎児数と死亡胎児総数を計算し胎児死亡率を算出した。ウイルスを接種しない無処置対照群についても妊娠14日に解剖し、同様の方法で胎児死亡率を算出した。

JEV接種群と無処置対照群の胎児死亡率をマウス系統ごとに比較したところ、表1に示す結果が得られた。

Table 1. Comparison of rate of fetal death in mice inoculated and uninoculated with JEV

Strain of mice	Group	No. of pregnant mice	Total No. of fetuses	No. of dead fetuses	Rate of fetal death (%)	χ^2 test
CFW	Inoculated	38	458	94	20.5	**
	Uninoculated	20	218	11	5.0	
C3H/He	Inoculated	45	437	133	30.4	**
	Uninoculated	22	187	31	16.6	
C57BL/6	Inoculated	15	143	18	12.6	*
	Uninoculated	20	171	10	5.8	
Total	Inoculated	98	1,038	245	23.6	**
	Uninoculated	62	576	52	9.0	

* : $P \leq 0.05$.

** : $P \leq 0.01$.

CFWの胎児死亡率は、接種群が20.5%、対照群が5.0%であった。C3H/Heの胎児死亡率は、接種群が30.4%、対照群が16.6%であった。C57BL/6の胎児死亡率は、接種群が12.6%、対照群が5.8%であった。

全体では、接種群が23.6%、対照群が9.0%であった。このように、いずれのマウス系統においても接種群の胎児死亡率は対照群のそれよりも有意に高かった。

2. 死亡胎児及びその付属胎盤からのウイルス回収
前項で述べたウイルス接種群の死亡胎児総数245のうち、胎盤、胎児のいずれからもウイルスが回収されなかったものが116例あった(表2)。これは検査した胎盤、胎児総数1,038の11.2%にあたるが、この死亡

胎児出現率と無処置対照群の胎児死亡率9.0%との間には有意差が認められなかった。残りの129例のうち、114例(88.4%)には胎盤と胎児の感染が認められ、15例(11.6%)では胎盤のみの感染が認められた。

Table 2. Virus recovery from dead fetuses and their placentae in pregnant mice inoculated with JEV

Group	No. of pregnant mice	Total No. of fetuses	Virus recovery	No. of dead fetuses	Rate of fetal death(%)
Inoculated	98	1038	+	129	12.4
			-	116	11.2
Uninoculated	62	576	-	52	9.0

* Viruses were recovered from 114 fetuses and their placentae, and from 15 placentae of the 129 dead fetuses.

Table 3. Relationship between fetal death and infection of placentae and fetuses in pregnant mice inoculated with JEV

Strain of mice	Fetuses	Total No. of fetuses	Infection of placentae and fetuses*			
			P(+), F(+)	P(+), F(-)	P(-), F(+)	P(-), F(-)
CFW	Alive	364	60 (16.5%)	108 (29.7%)	4 (1.1%)	192 (52.7%)
	Dead	59	42 (71.2%)	5 (8.5%)	1 (1.7%)	11 (18.6%)
C3H/He	Alive	304	61 (20.1%)	45 (14.8%)	7 (2.3%)	191 (62.8%)
	Dead	84	64 (76.2%)	10 (11.9%)	1 (1.2%)	9 (10.7%)
Total	Alive	668	121 (18.1%)	153 (22.9%)	11 (1.6%)	383 (57.3%)
	Dead	143	106 (74.1%)	15 (10.5%)	2 (1.4%)	20 (14.0%)

* P : placenta, F : fetus, (+) : positive infection, and (-) : negative infection.

3. JEV 接種妊娠マウスにおける胎児死亡と胎盤、胎児感染との関係

CFW と C3H/He の 2 系統の妊娠 7 日目マウスに 10^8 TCID₅₀/m μ のウイルス液 0.2m μ を静脈内接種したのち 7 日目に解剖し、胎児の生存例と死亡例について、それぞれの胎盤、胎児感染の有無を調べたところ、表 3 に示す結果が得られた。

CFW の場合、生存胎児 364 例の 52.7% (192/364) には胎盤、胎児のいずれにも感染が認められず、胎盤と胎児、あるいはいずれか一方に感染が認められた例

は 47.3% (172/364) であった。それに対して、死亡胎児 59 例の 81.4% (48/59) には、胎盤と胎児、あるいはいずれか一方に感染が認められ、胎盤、胎児のいずれにも感染が認められなかったのは 18.6% (11/59) にすぎなかった。

C3H/He の場合、生存胎児 304 例の 62.8% (191/304) には胎盤、胎児のいずれにも感染が認められず、胎盤と胎児、あるいはいずれか一方に感染が認められた例は 37.2% (113/304) であった。それに対して、死亡胎児 84 例の 89.3% (75/84) には、胎盤と胎児、

あるいはいずれか一方に感染が認められ、胎盤、胎児のいずれにも感染が認められなかったのは10.7% (9/84) にすぎなかった。

CFWとC3H/Heの両系統をあわせて、全体としてみると、生存胎児668例の57.3% (383/668) には胎盤、胎児のいずれにも感染が認められず、胎盤と胎児、あるいはいずれか一方に感染が認められた例は42.7% (285/668) であった。それに対して、死亡胎児143例の86.0% (123/143) には胎盤と胎児、あるいはいずれか一方に感染が認められ、胎盤、胎児のいずれにも感染が認められなかったのは14.0% (20/143) にすぎなかった。

死亡胎児143例の74.1% (106/143) には胎盤と胎児の両方の感染が認められたが、胎盤のみの感染による死亡胎児が10.5% (15/143)、胎児のみの感染による死亡胎児が1.4% (2/143) 認められた。

胎児感染が認められた例は、生存胎児、死亡胎児を含め全体で240例であったが、そのうちの227例 (94.6%) は、その付属胎盤の感染を伴っており、胎盤感染が証明できなかったのは13例 (5.4%) にすぎなかった。

4. 胎児死亡と胎盤、胎児のウイルス量との関係

JEV接種マウスのうち胎盤と胎児のウイルス感染が証明された28例について、胎児死亡と胎盤、胎児ウイルス量との関係を調べたところ、生存胎児17例の平均胎児ウイルス量は $10^{3.4}$ TCID₅₀/g、死亡胎児11例の平均胎児ウイルス量は $10^{4.5}$ TCID₅₀/gで、両者の間に有意差は認められなかった。しかし、平均胎盤ウイルス量では、生存胎児例が $10^{3.8}$ TCID₅₀/g、死亡胎児例が $10^{5.6}$ TCID₅₀/gで、両者の間に有意差が認められ、胎盤ウイルス量が人である場合に胎児死亡が多発する傾向がみられた。

5. 胎盤の病理組織学的検査

ウイルスに感染した胎盤の組織病変をヘマトキシリン・エオジン染色により調べた (図1)。

脱落膜細胞の壊死が正常マウスに比較して多く、giant cellの壊死が多いためか、giant cell layerが不明瞭であった。giant cell及びtrophoblastの核濃縮及び崩壊が認められ、spongiotrophoblastの細胞膜の境界が不明瞭となり、あるいは崩壊していた。胎盤迷路の血管は拡張、充血し、胎児側の血管内には有核赤血球が多数みられた。胎盤迷路に残存するtrophoblastの一部に核濃縮及び崩壊がみられた。

蛍光抗体法により胎盤組織におけるウイルスの増殖

部位を調べた (図2, 3)。

一般に、giant cell及びtrophoblastに特異蛍光が認められたがspongiotrophoblastには認められなかった。胎児が感染している場合には、胎盤迷路のtrophoblastや血管内皮細胞にも特異蛍光が認められた。

6. JEV接種後自然分娩させた場合の死亡胎児の出現と胎児、胎盤からのウイルス回収

妊娠マウスがJEVに感染した場合に死産が起こるかどうかを調べるため妊娠10日目のCFWとC3H/HeにJEVを接種した後、自然分娩させたところ、表4に示す結果が得られた。

試験マウス6頭のうち、3頭のCFW系マウスと1頭のC3H/He系マウスが死亡胎児を娩出した。マウスNo.1の娩出した7頭の死産子からはウイルスが回収されたが、マウスNo.3, 4, 5の娩出した死産子からはウイルスは回収されなかった。これら4頭のマウスは死産子とともに生存子も分娩した。マウスNo.4の分娩した生存子1例からウイルスが回収されたが、他の生存子からはウイルスは回収されなかった。

分娩開始後約20時間に親マウスを解剖したところ、一部のマウスの子宮内に胎児が残存していた。マウスNo.3では1頭の死亡胎児が残存していて、その胎児からはウイルスは回収されなかったが、付属胎盤からウイルスが回収された。マウスNo.4では生存胎児9頭が残存していて、その内、1頭では胎児とその付属胎盤から、6頭では付属胎盤のみからウイルスが回収された。

考 察

JEV接種群と無処置対照群における胎児死亡率を比較したところ、CFW, C3H/He, C57BL/6のいずれのマウス系統においても接種群の胎児死亡率は対照群のそれよりも有意に高いことから、妊娠マウスがJEVに感染した場合に胎児死亡が起こるものと考えられた。

JEV接種群の死亡胎児のうち胎盤、胎児感染が認められなかった例が全体で約11%みられたが、死亡胎児の自然発生率との間に有意差が認められないことから、これらの死亡胎児のほとんどは、使用したマウスで自然発生する胎児死亡とみなすことができると考えられた。

胎児死亡例の方が胎児生存例よりも胎盤、胎児感染率が明らかに高率であることから、胎盤、胎児感染に

よって胎児死亡が起こるものと考えられた。なお、胎児感染が認められた例では、そのほとんどが付属胎盤の感染を伴っていること、胎児感染は認められずに胎盤感染のみ認められた死亡胎児例が全体で約10%みられたこと、胎盤から回収されるウイルス量が多いほど

胎児死亡が多発する傾向があること、胎盤感染によって胎盤の機能障害が起こると考えられる病理組織学的所見がみられること、などの成績は、胎児死亡の原因として胎盤感染による胎盤機能の障害が重要な役割を果たすものと考えられた。

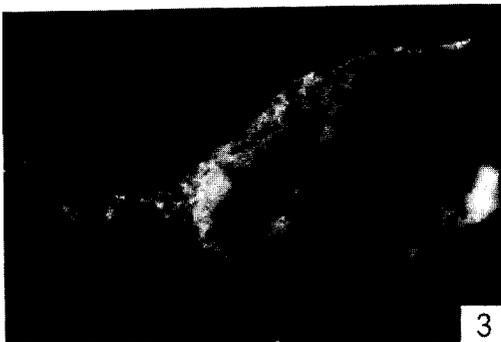
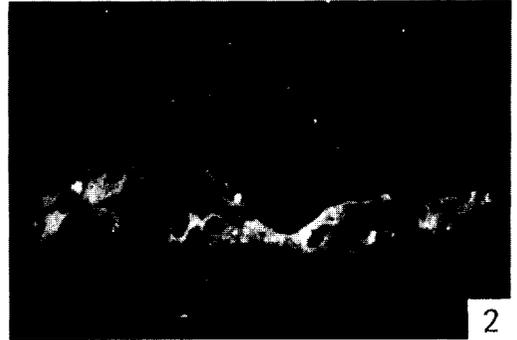
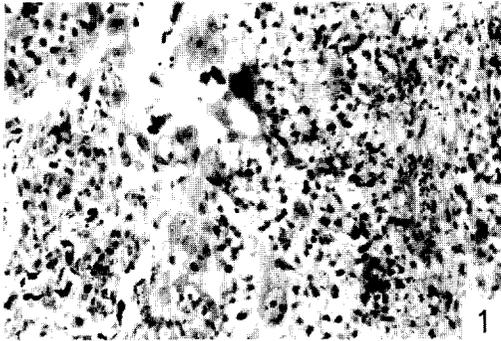


Fig. 1. Histopathological lesion in placenta of pregnant mouse inoculated with JEV. Viruses were recovered from the placenta at a titer of $10^{8.9}$ TCID₅₀/g and from the fetus at a titer of $10^{9.0}$ TCID₅₀/g in this mouse. Hematoxylin and eosin staining, $\times 240$. Left side : fetal placenta. Right side : maternal placenta.

Fig. 2. Specific viral antigens detected by immunofluorescence in giant cells of the trophoblast in the infected placenta. Viruses were recovered from the placenta at a titer of $10^{5.2}$ TCID₅₀/g and from the fetus at a titer of $10^{5.3}$ TCID₅₀/g in this case. $\times 240$. Upper side : fetal placenta. Lower side : maternal placenta.

Fig. 3. Specific viral antigens detected by immunofluorescence in cytoplasm of giant cells of the trophoblast in the infected placenta. $\times 960$. High magnification of Fig. 2.

Table 4. Incidence of stillbirth and recovery of virus from fetuses among pregnant mice showing spontaneous delivery after inoculation with JEV

No.	Mice Strain	Inoculation		Neonate		No. of fetuses retained in uterus
		Route* ¹	Dose* ²	Dead	Alive	
1	CFW	iv	2.7	7 (+)* ³	1 (-)* ³	0
2	CFW	iv	4.5	0	12 (-)	0
3	CFW	ip	4.3	2 (-)	8 (-)	1 * ⁴ (+)
4	CFW	iv	5.2	1 (-)	1 (+)	9 * ⁵ (+)
5	C3H/He	ip	5.5	3 (-)	6 (-)	0
6	C3H/He	ip	5.0	0	9 (-)	0

*¹ iv : intravenous, ip : intraperitoneal.

*² log TCID₅₀.

*³ Positive (+) and negative (-) virus recovery.

*⁴ Dead fetus (virus was recovered from the placenta but not from the fetus).

*⁵ Alive fetuses (viruses were recovered from 7 of the placentae and one of the fetuses).

妊娠マウスにJEVを接種したのち自然分娩させたところ、6頭中4頭が死亡胎児を娩出したことから、妊娠マウスがJEVに感染すると死産が発生するものと考えられた。死産子のうち胎児組織からウイルスを回収できない例があった。それらの付属胎盤は親マウスが食したので採取できずウイルス回収を試みることができなかったので断定できないが、胎盤感染のみによる胎児死亡の例が含まれていたのではないかと推察された。なお、JEVによる豚死産の自然発生の例のなかには、死産胎児からのJEV回収には成功しなかったが、後産からJEVが回収できた例が経験されている(未発表)。

引用文献

- 藤崎優次郎ほか：日本脳炎ウイルス予防液による豚死産予防試験。家畜衛試研究報告 第70号, 1-6 (1974)。
- Fujisaki, Y. et al. : Immunization of pigs with the attenuated S strain of Japanese encephalitis virus. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 15, 55-60 (1975)。
- Fujisaki, Y. et al. : Experimental studies on vertical infection of mice with Japanese encephalitis virus. I. Effect of mouse strain on placental and fetal infection. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 16, 97-106 (1976)。
- Fujisaki, Y. et al. : Experimental studies on vertical infection of mice with Japanese encephalitis virus. II. Effect of inoculation route on placental and fetal infection. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 17, 39-44 (1977)。
- Fujisaki, Y. et al. : Experimental studies on vertical infection of mice with Japanese encephalitis virus. III. Effect of gestation days at the time of inoculation on placental and fetal infection. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 22, 95-101 (1982)。
- Fujisaki, Y. et al. : Experimental studies on vertical infection of mice with Japanese encephalitis virus. IV. Effect of virus strain on placental and fetal infection. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 23, 21-26 (1983)。
- 藤崎優次郎ほか：マウスを用いた日本脳炎ウイルスの実験的垂直感染における胎盤感染と胎児感染の関係。家畜衛試研究報告 第90号, 9-16 (1987)。
- Kawamura, A. : *Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications*. University of Tokyo Press, Tokyo (1977)。
- 清水武彦, 川上善三：豚の流行性死産に就いて。(特に日本脳炎との関係について, 第1編, 自然材料について)。家畜衛試研究報告 第22号, 117-128 (1949)。
- 清水武彦ほか：妊娠ブタの日本脳炎ウイルスによる実験的死産。家畜衛試研究報告 第30号, 51-66 (1955)。
- 菅原茂美ほか：豚の死流産実態調査。I. 日本脳炎流行と死流産発生状況。日獣会誌 26, 431-435 (1973)。
- Sugimori, T. et al. : Hemagglutinin of Japanese encephalitis virus produced in embryonic swine kidney cell cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 9, 55-64 (1969)。

SUMMARY

Relationship between Placental and Fetal Infections, and Fetal Death in Experimental Vertical Infection of Mice with Japanese Encephalitis Virus

Yosuke MURAKAMI¹, Yujiro FUJISAKI², Yasuo MIURA³,
Tadashi SUGIMORI⁴, Takashi ONODERA⁵ and Katsuhiko MIURA⁶

- 1 *National Institute of Animal Health (NIAH), (Present address : Exotic Diseases Research Division, NIAH, 1500 Josui-honcho, Kodaira-shi, Tokyo, 187 Japan).*
- 2 *The same institute (Present address : Research Center for Veterinary Science, The Kitasato Institute, 1139-1, Matsugasaki, Kashiwa-shi, Chiba-ken, 277 Japan).*
- 3 *The same institute (Present address : Kyushu Branch, NIAH, 2702 Chuzancho, Kagoshima-shi, Kagoshima-ken, 891-01 Japan).*
- 4 *The same institute (Present address : Exotic Diseases Research Division, NIAH, 1500 Josui-honcho, Kodaira-shi, Tokyo, 187 Japan).*
- 5 *Institute of Medical Science, University of Tokyo, (Present address : Exotic Diseases Research Division, NIAH, 1500 Josui-honcho, Kodaira-shi, Tokyo, 187 Japan).*
- 6 *National Institute of Animal Health (Present address : National Institute of Animal Industry, 2 Ikenodai, Kuzizaki-machi, Inashiki-gun, Ibaraki-ken, 305 Japan).*

An experiment was carried out with mice to study a relationship between infection of the placentae and fetuses, and fetal death in experimental vertical infection with Japanese encephalitis virus.

Mice of three strains, CFW, C3H/He and C57BL/6, were intravenously inoculated with a field strain of the virus at 7 days of pregnancy. They were sacrificed 7 days after virus inoculation and examined for infection of the placentae and fetuses and fetal death. The rate of fetal death in the inoculated mice was remarkably higher than that in the uninoculated control mice. No significant difference was observed in the incidence of fetal death between the inoculated mice which were proved to be free from placental and fetal infection, and the uninoculated control mice. The rates of placental and fetal infections in the case with dead fetus were significantly higher than those in the case with alive fetus. Some of the fetuses probably died only from placental infection. The incidence of fetal death became high according to an increase in virus content in the placenta. Specific antigens of the virus were demonstrated by immunofluorescence in giant cells of the trophoblast in the infected placentae. Histopathological changes were observed in the placental tissues, particularly in their trophoblasts. Consequently, it was presumed that placental infection with the virus resulted in the functional disorder of the placenta. These results indicated that some fetuses died from placental and fetal infection in pregnant mice inoculated with Japanese encephalitis virus, and that the placental infection with the virus might be closely related to the fetal death.

Pregnant mice which were intravenously or intraperitoneally inoculated with the virus, delivered dead and alive fetuses, and the virus was also recovered from some of these fetuses. These results indicated that stillbirth might occur in pregnant mice, as well as in pregnant sows, when infection with Japanese encephalitis virus took place during pregnancy.